

## 瓦松 추출물이 면역체계에 미치는 영향

권진\* · 한광수\*\*†

\*군장대학 의부행정과, \*\*우석대학교 허브자원학과

### Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger on the Immune System

Jin Kwon\* and Kwang Soo Han\*\*†

\*Dept. of Medical Administration, Kunjang College, Kunsan 573-709, Korea.

\*\*Dept. of Herb Resource, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea.

**ABSTRACT :** The purpose of this research was to investigate the effect of *Orostachys japonicus* A. Berger (OJB) on the immune system. Administration of OJB (500 mg/kg) enhanced viability of splenocytes and thymocytes in BALB/c mice, and also OJB increased of splenic T lymphocytes, significantly, increased CD4 positive T<sub>H</sub> cells and CD8 positive T<sub>C</sub> cells. OJB markedly, enhanced the production of  $\gamma$ -interferon in mice serum. OJB accelerated the apoptosis of L1210 and U937 leukemia cells and increased the expression of apoptosis-related ICE, c-myc, p53 gene. These results suggest that OJB have an immuno-regulatory and anti-cancer activity.

**Key words :** immune system,  $\gamma$ -interferon, apoptosis, anti-cancer activity

## 서론

와송 (*Orostachys japonicus* A. Berger)은 일명 岩松, 屋松 등으로 불리는 들나물과의 다년생 초본식물로서 오래된 기와지붕이나 깊은 산의 바위위에서 자라는 식물이다. 근생엽은 로제트형으로 다발적인 출현을하며, 가을철에 줄기 끝에 황백색의 작은꽃이 이삭처럼 모여서 핀다. 약리적으로는 혈관수축 작용과 호흡흥분 작용, 장관의 긴장도증강 작용 등이 보고되어 있으며 (鄭, 1990), 한방에서는 해열, 소종, 지혈, 이뇨 등에 사용되고, 민간요법으로 암치료에도 많이 사용되고 있으나 (양, 1989; 박, 1992) 와송추출물의 면역능에 대한 실험적 보고는 아직 미비한 실정이다.

따라서 와송이 면역계 및 암세포의 아포토시스에 미치는 영향을 살펴보고자 와송추출물을 생쥐에 투여한 후 비장 및 흉선세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하였으며

T, B림파구의 아집단분석, 혈청 중 cytokine 생성능 및 생쥐와 사람의 백혈병세포내 아포토시스에 미치는 효과 등을 관찰하여 얻어진 결과들을 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 세포주

실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계통 (♂, 20±2 g)을 대한실험동물(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2℃, 습도 55±5%, dark/light (12 시간)조건 하에서 고형 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다. 계대배양 세포주로서는 한국세포주 은행 (KCLB)에서 분양받은 L1210 (mouse leukemia cell line: KCLB No. 10219)세포 및 U937 (human monocyte like, histiocytic cell line: KCLB No. 21593)세포를 사용하였다.

† Corresponding author : (Phone) +82-63-290-1482 (E-mail) han123@woosuk.ac.kr

Received May 24, 2004 / Accepted July 21, 2004

## 2. 시약 및 기구

시약은 RPMI1640, fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), concanavalin A (Con A), lipopolysaccharide (LPS), thioglycolate, ethidium bromide, propidium iodide 등은 Sigma사, PE conjugated anti-CD4, FITC conjugated anti-CD8, PE-anti B220, FITC-anti Thy 1 monoclonal antibody (Caltag), anti-murine IFN- $\gamma$  antibody, anti-murine IL-4 antibody (Pharmingen), anti-rabbit Bcl-2 antibody (Santa cruz), TEMED, Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo (dT), PCR marker (Promega), dNTP set (Amersham Pharmacia) 등을 사용하였다. 사용기구는 96 well microplate (Costar), inverted microscope (Zeiss), flow cytometer (Coulter, EPICS-XL), ELISA reader (Molecular Devices, VERSAmax), 그 외 centrifuge (VS-15000CF), CO<sub>2</sub> incubator, freeze dryer, deep freezer 등은 Vision사의 제품을 사용하였다.

## 3. 검액의 조제

실험에 사용한 외충은 2003년 10월 경주시 탑동의 고가 건물 지붕에서 채취하여 동결건조한 후 사용하였다. 시료 100 g을 90%의 MeOH로 추출한 후, 여과해서 얻어진 여액을 rotary evaporator로 농축하고 동결 건조해서 분말 9.75 g을 취득 (이하 OJB라 함)하였으며, 이후 동물실험 시에는 생리식염수, 세포배양용에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다.

## 4. MTT법에 의한 비장 및 흉선세포의 생존율 측정

MTT법 (Mosmann, 1983)에 의해 생쥐에 OJB (500 mg/kg)를 7일 동안 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음, 각 세포 부유액을 조제하여  $1 \times 10^6$  cells/well로 세포수를 조정하고 비장세포 부유액에는 LPS (5  $\mu$ g/ml), 흉선세포 부유액에는 Con A (0.5  $\mu$ g/ml)를 첨가하여 48시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A (pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu$ l로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다.

## 5. 비장 및 흉선세포의 아집단 (subpopulation) 측정

Shortman & Backson (1974) 등의 방법으로 생쥐에 OJB (500 mg/kg)를 7일 동안 경구 투여한 후, 생쥐를 경

추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음, 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하여  $1 \times 10^6$  cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody (1:25 dilution)로 이중 염색하여 4°C에서 30분간 반응시키고 flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각각의 세포 중의 임파구 아집단을 측정하였다.

## 6. 혈청 cytokine(IFN- $\gamma$ , IL-4)의 측정

### 가. IFN- $\gamma$ 의 측정

IFN- $\gamma$ 의 측정은 sandwich ELISA법 (Enavall 등, 1972)으로 혈청 내 IFN- $\gamma$ 의 농도를 측정하였다. 4  $\mu$ g/ml 농도로 0.1 M phosphate buffer (pH 9.0)에 희석한 anti-mouse IFN- $\gamma$  antibody를 96 well microplate에 각 well당 100  $\mu$ l씩 코팅하여 4°C에서 24 시간 동안 반응시켜 흡착시켰다. 그 후 PBS로 2회 세척하고, 1% BSA-PBS를 각 well 당 150  $\mu$ l씩 가하여 실온에서 1 시간 동안 blocking을 하고 PBS로 3회 세척하였다. 1% BSA-PBS로 희석한 혈청 시료액과 표준용액 (recombinant mouse IFN- $\gamma$ )을 각 well당 100  $\mu$ l씩 넣어 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 그 후 2  $\mu$ g/ml 농도로 1% BSA-PBS에 희석한 biotinylated conjugated anti-murine IFN- $\gamma$  antibody를 각 well 당 100  $\mu$ l씩 넣어 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하고 2  $\mu$ g/ml 농도로 희석한 streptavidin-alkaline phosphatase를 각 well당 100  $\mu$ l씩 가하고 다시 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 후 p-nitrophenyl phosphate 용액을 각 well당 100  $\mu$ l씩 가하고 실온 차광 하에서 발색반응을 시켰다. 30분 후 50  $\mu$ l의 3N NaOH용액으로 반응을 정지시키고, 30분 내에 ELISA reader로 405 nm 파장에서 흡광도를 측정해서 비교하였다.

### 나. IL-4의 측정

IL-4의 측정은 IFN- $\gamma$ 의 측정방법에 준하였다.

## 7. Flow cytometer에 의한 백혈병세포의 아킵토시스 측정

Nicoletti et al. (1991) 등의 방법으로 계대배양 중인 L1210세포 및 U937세포에 OJB (1-100  $\mu$ g/ml)를 첨가한 후, 24 시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정 ( $\times 3$ 회, 1,500 rpm, 5분)한 후, 침전시킨 세포분획에 PI (10  $\mu$ g/ml)를 20  $\mu$ l/ $1 \times 10^6$  cells의 농도로 염색 (4°C, 30분간 반응)한 다음 flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 620 nm)를 이용해서 sub-G1 peak를 정량하였다.

8. RT-PCR에 의한 ICE, c-myc, p53 mRNA의 발현

U937세포에 10 µg/ml의 OJB를 첨가한 후, 24 시간 동안 배양하고 U937 세포에서 RNA를 분리하였다. Total RNA는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법 (Birch *et al.*, 1996)에 준하였다. cDNA는 M-MLV reverse transcriptase와 random hexamer를 primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Perkin Elmer 2400 thermocycler에서 30 cycle동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 95°C에서 30초간 denaturation 시킨 후, 55°C에서 30초간 annealing시키고, 72°C에서 30초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하였다. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다: ICE sense (5'-AAT GCT GCT ACA AAA TCT GG-3'), ICE antisense (5'-ATC ATC CTC AAA CTC TTC TG-3'), c-myc sense (5'-CGT CTC CAC ACA TCA GCA CA-3'), c-myc antisense (5'-CCG CAA CAA GTC CTC TTC AG-3'), p53 sense (5'-CCT CCT GGC CCC TGT CAT CT-3'), p53 antisense (5'-ACA AAC ACG CAC CTC AAA GC-3').

9. 통계처리

통계처리는 Student's t-test (Dowdy, 1983)로 하였으며, p<0.05이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 비장 및 흉선세포의 생존율에 미치는 효과

생쥐에 OJB를 경구 투여하고 비장 및 흉선세포의 생존율을 측정 한 결과, 비장세포에서 대조군 LPS (5 µg/ml) 처리에서의 세포생존율을 100%로 하였을 때, OJB 투여군에

서는 117.4±4.3%로 비장세포의 생존율을 유의하게 촉진시켰으며, 흉선세포에서도 대조군 Con A (0.5 µg/ml) 처리에 비하여 OJB 투여군에서 110.8±5.7%로 흉선세포의 생존율이 촉진되는 경향이였다 (Table 1).

Table 1. Effect of cell viability on the OJB-administered mouse splenocytes and thymocytes *in vivo*†.

Treatment	Cells	Splenocytes (%)	Thymocytes (%)
		LPS (+)	Con A (+)
CONTROL		100.0±4.5	100.0±4.2
OJB		117.4±4.3†	110.8±5.7

† OJB (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter each cells were collected, and splenocytes and thymocytes were incubated for 48 hours. The cells were assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Each data represents the mean±S.E. of 3 experiments.

‡ Significantly different from normal saline-treated control group (p<0.05).

2. 비장 및 흉선세포의 임파구 아집단에 미치는 효과

OJB를 투여한 생쥐의 비장 및 흉선세포의 임파구 아집단 변화를 살펴보면, 비장세포는 대조군에서 B, T세포가 각각 36.1±3.4 및 22.4±2.3%, OJB 투여군에서 각각 38.8±3.9 및 31.1±1.7%로 특히 T 세포가 현저하게 증가하였으며, 비장 T세포 중 TH 세포는 대조군이 14.0±1.1%, Tc 세포는 7.6±0.7%이었으며 OJB 투여군은 각각 21.7±1.3% 및 11.2±1.2%로 TH 세포와 Tc 세포 모두 유의성있게 증가하였다. 흉선세포에서는 대조군과 비교하여 OJB 투여군에서 유의성있는 차이는 관찰되지 않았다 (Table 2).

Table 2. Lymphocyte subpopulation change of splenocytes and thymocytes in OJB-administered mice†.

Treatment	Cell Type	Splenocytes (%)		Thymocytes (%)		
		B cell	T cell		TH	Tc/Ts
			TH	Tc/Ts		
CONTROL		36.1±3.4	22.4±2.3	9.1±0.8	4.5±0.5	
OJB		38.8±3.9	14.0±1.1	7.6±0.7	10.7±1.2	5.7±0.6
			31.1±1.7*‡	11.2±1.2*		

† OJB (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter splenocytes and thymocytes were collected and lymphocyte subpopulation was measured by a flow cytometer. The cells were staining with PE/FITC conjugated anti-B220/Thy1 or CD4/CD8 monoclonal antibody. Each data represents the mean±S.E. of 5 mice.

‡ Significantly different from the control group (\*p<0.05).

3. 혈청 중 cytokine 생성에 미치는 효과

OJB를 투여한 생쥐의 혈청 interferon- $\gamma$ 와 IL-4의 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과 interferon- $\gamma$ 는 대조군에서는  $21.9 \pm 1.9$  pg/ml이었으며, OJB 투여군에서는  $38.1 \pm 4.7$  pg/ml로 유의성있는 증가를 보였다. 반면, IL-4는 대조군에서는  $15.6 \pm 1.4$  pg/ml인데 비하여 OJB 투여군에서는  $18.9 \pm 1.7$  pg/ml으로 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1).

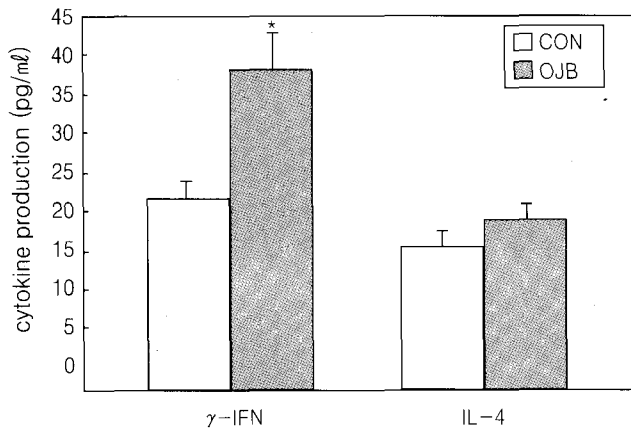


Fig. 1. Effect of OJB on the cytokine production in mouse serum. OJB (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the cytokine of collected mouse serum was assayed with ELISA kit. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice. IFN- $\gamma$  : Interferon- $\gamma$ , IL-4 : Interleukin-4.

4. 이식된 L1210세포의 아포토시스에 미치는 효과

L1210세포를 생쥐의 복강에 이식하고 OJB를 경구 투여한 다음, 복강에 이식된 L1210세포를 수집하여 sub-G1 peak를 측정된 결과, 대조군에 비해 OJB 투여군에서 이식된 L1210세포의 유의성있는 아포토시스가 관찰되었다 (Fig. 2).

5. 배양 백혈병세포의 아포토시스에 미치는 효과

L1210세포 배양계에 OJB (1-100  $\mu$ g/ml)를 첨가해서 24시간 동안 배양한 결과, 대조군에 비하여 각 농도의 OJB 첨가군에서 배양 L1210세포의 아포토시스가 현저하게 촉진되었으며, 또한 사람의 백혈병세포주인 U937 세포 배양계에서도 대조군에 비하여 각 농도의 OJB 첨가에 의해 U937세포의 아포토시스가 유의성있게 촉진되었다 (Table 3).

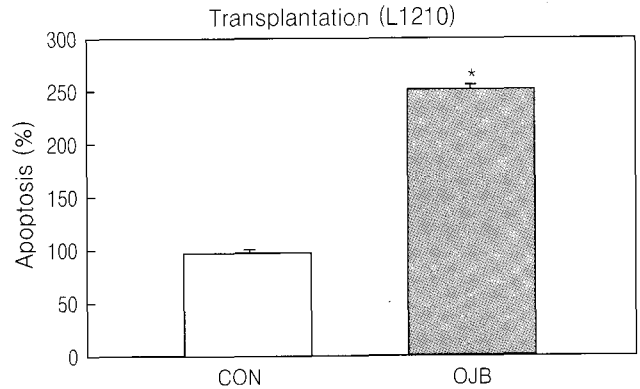


Fig. 2. Effect of OJB on the apoptosis of transplanted L1210 cells in mouse peritoneal cavity. L1210 cells were transplanted to peritoneal cavity of mouse and OJB (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter L1210 cells were collected, the sub-G1 peak stained with propidium iodide was measured by a flow cytometer. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

Table 3. Effect of OJB on the apoptosis of cultured L1210 and U937 leukemia cells<sup>†</sup>.

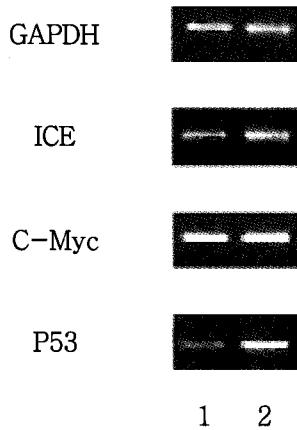
Treatment ( $\mu$ g/ml)	Cell Type	
	L1210 cell (%)	U937 cell (%)
CONTROL	$17.4 \pm 2.0$	$21.5 \pm 2.3$
OJB (1)	$23.7 \pm 2.4$ *	$25.4 \pm 2.7$
OJB (10)	$29.3 \pm 2.8$ * <sup>†</sup>	$32.5 \pm 3.0$ *
OJB (100)	$41.1 \pm 3.3$ **	$39.9 \pm 3.5$ **

<sup>†</sup> OJB was treated with cultured L1210 or U937 cells, incubated for 24 hours, and each cells were collected, and the sub-G1 peak stained with propidium iodide was measured by a flow cytometer. The data represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.

\* Significantly different from control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

6. RT-PCR에 의한 ICE, c-myc, p53 mRNA의 발현양상

U937세포 배양계에 OJB (10  $\mu$ g/ml)를 처리하고 24시간 동안 배양한 다음, U937세포에서 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 PCR을 시행하였고, 1% agarose gel에서 전기영동한 결과 (Fig. 3), 대조군에 비하여 OJB 처리군에서 아포토시스 관련 유전자인 ICE, c-myc, p53의 mRNA 발현이 전반적으로 증가하고 있음을 관찰하였다.



**Fig. 3.** Expression of apoptosis-related genes(ICE, c-myc, p53). Treatment of OJB for 24 hours leads to increase in the expression of ICE, c-myc and p53 in U937 leukemia cells. Lane 1 is a control and lane 2 is the cells treated with 10 µg/ml of OJB for 24 hours.

**고 찰**

면역계의 기능으로는 방어기능, 항상성 유지기능, 감독기능 등이 있는데 방어기능은 외부로부터의 면역자극에 대한 반응을 나타내는 기능으로, 미생물의 자극에 대한 방어 기능이 비정상적으로 과도하게 나타나면 알레르기 반응을 보이고, 반대로 비정상적으로 낮게 나타나면 그 미생물에 감염되는 <기회감염>을 일으키게 된다. 항상성 유지기능은 생체의 내부환경을 항상 평형상태로 유지시켜주는 기능으로, 어떤 면역자극에 의해 이 기능이 지나치게 커지게 되면 면역계 고유의 기능인 <자기>와 <비자기>를 판별할 능력을 잃게 되어 자기면역질환을 일으키게 된다. 감독기능은 면역자극에 대한 기능이 저하됨으로써 변이를 일으킨 세포를 제거하도록 하는 기능으로서, 감독기능이 제대로 되지 못할 경우에는 변이된 세포를 제거하지 못하여 악성종양을 야기한다 (Abbas *et al.*, 1994). 면역세포의 주역인 T림파구 중 CD4<sup>+</sup> 세포인 T<sub>H</sub>세포는 비자기를 인식해서 그 정보를 B림파구에 전달하고, 항원에 대하여 특이한 항체를 혈청 속에 만들어 내도록 촉진하는 중요한 기능을 가지고 있다. 항체를 만들어 내는 수순이 면역계에 기억되어, 동일한 항원이 다시 침입해 들어오는 경우에는 이 항체가 동원되어 항원을 효과적으로 처리한다 (Roitt *et al.*, 2001). 본 연구에서 비장 및 흉선세포의 증식반응, 임파구 아집단, 혈청 중 cytokine 생성능 등을 관찰하였는데, 외송은 주요 면역장기인 비장 및 흉선림파구의 생존율을 각각 117.4% 및 110.8%로 유의성있게 촉진시켰으며 또한

비장 및 흉선세포의 아집단을 분석한 결과, 비장내 T림파구를 증가 (22.4 %→31.1 %)시켰으며, T세포 중 특히 CD4<sup>+</sup>세포인 T<sub>H</sub>세포 (14.0 %→21.7 %)와 CD8<sup>+</sup>세포인 Tc세포 (7.6 %→11.2 %)를 증가시켜 생체의 면역력을 조절하는 것으로 추정된다. 또한 혈청 중  $\gamma$ -interferon의 생성을 증가 (21.9±1.9 pg/ml→38.1±4.7 pg/ml)시켰는데 이는 외송이 특히 T<sub>H</sub>세포를 활성화시키는 결과를 의미한다 (Fong *et al.*, 1989). 한편, 아폽토시스는 조직의 과사와는 전혀 다른 세포사의 기전으로서 (Kerr *et al.*, 1972), 이는 세포가 죽을 때 사전에 이미 준비된 상태에서 사망프로그램을 가동시켜 죽음에 돌입한다는 자발적인 사망기전이다. 아폽토시스는 복잡하면서도 잘 조절되어 있는 세포의 능동적인 사망과정으로 이 과정을 통하여 각각의 세포는 이웃 세포에 손상을 주지 않고, 어떠한 염증반응도 유도하지 않고 스스로 죽음의 과정을 시작하게 된다 (Kerr *et al.*, 1994). 이러한 아폽토시스가 일어나지 않아서 초래되는 세포 생존환경의 변화는 각종 암, 바이러스 감염, 자기면역질환, 신경퇴행성질환, AIDS 등 다양한 질병의 발생기전에 관련하고 있는 것으로 보이며, 이러한 질환에 대한 치료는 아폽토시스를 활성화시켜 줌으로써 질병의 진행을 억제하는 것에 중점을 두고 있다 (Thompson, 1995).

본 실험에서 외송은 복강에 이식한 L1210세포의 아폽토시스를 현저하게 (약 2.5 배) 촉진시켰으며 계대배양한 L1210세포와 U937세포 등의 백혈병세포의 아폽토시스를 농도의존적으로 촉진시켰고, 아폽토시스 관련 유전자인 ICE, c-myc, p53의 mRNA 발현을 증가시켰다. 이상의 실험 결과로 보아 외송은 주요 면역세포인 임파구의 활성을 향진시키는 면역조절능력과 백혈병세포의 아폽토시스를 촉진시키는 항암능력을 보유하고 있는 것으로 추정된다.

**적 요**

외송 (OJB)의 면역 및 항암 효과를 관찰한 결과, 외송은 생쥐의 비장 및 흉선세포의 생존율을 증가시켰으며, 임파구 아집단분석 결과 비장 T세포를 유의성있게 증가시켰는데 비장 T세포 중의 T<sub>H</sub>세포 및 Tc세포가 모두 증가되었고, 혈청 중  $\gamma$ -interferon의 생성을 현저하게 증가시켰다. 또한 외송은 L1210세포 및 U937세포 등의 백혈병세포의 아폽토시스를 촉진시키는 항암능력을 보유하고 있었다.

**LITERATURE CITED**

Abbas AK, Lichman AH, Poper JS (1994) Cellular and molecular

- immunology 2: 241-260, W.B. Saunders, USA.
- Birch DE, Kolmodin L, Laird WJ, McKinney N, Wong J, Young KKY, Zangenberg Dowdy S, Weardon S** (1983) Statistics for research. p. 262, Wiley, U.S.A.
- Roitt I, Brostoff J, Male D** (2001) Immunology 4th ed: 11.1-11.14, Mosby London GA, Zoccoli MA, (1996), Simplified Hot-Start PCR. Nature 381:445-446.
- Enavall E, Perlmann P** (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay. III, Quantitation of specific antibodies of enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol. 109:129-135.
- Fong TA, Mosmann TR** (1989) The role of interferon-gamma in delayed type hypersensitivity mediated by Th1 clones. J. Immunol 143:2887-2893.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV** (1994) Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 73:2013-2026.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26:239-257.
- Mosmann T** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods 65:55-63.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani G, Riccardi CA** (1991) Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods 139:271-279.
- Shortman K, Backson H** (1974) The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. Cell. Immunol. 12:230-246.
- Thompson CB** (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267:1456-1462.
- 박희준** (1992) 와송의 화학성분 및 항돌연변이 활성에 관한 연구. 한국생명과학회지 2(1):69-71.
- 양서현** (1989) 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 瓦松이 흰쥐의 자연살해세포에 미치는 영향. 대한한의학회지 10(2):103-114.
- 鄭普燮** (1990) 鄉藥大事典. 永林社. p. 600.